

MENU **SEARCH** **INDEX** **DETAIL** **JAPANESE**

1 / 1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-063154

(43)Date of publication of application : 29.02.2000

(51)Int.Cl.

C03C 17/32
C09D177/04
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
// C08G 69/10

(21)Application number : 10-228426

(71)Applicant : MITSUBISHI CHEMICALS CORP

(22)Date of filing : 12.08.1998

(72)Inventor : HATAKEYAMA KAZUHISA

(54) GLASS PLATE FOR IMMOBILIZING NUCLEIC ACID**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable stable immobilization of a nucleic acid such as DNA on the surface of a glass plate in high efficiency by coating the surface of the plate with a polymer having carboxyl group as a functional group.

SOLUTION: A coating agent having a polymer concentration of 0.01-50 g/L, preferably 0.5-5.0 g/L is produced by dissolving a polymer having a molecular weight of 500-500,000, preferably 1,000-200,000 and containing carboxyl group as a functional group in water and adjusting the pH of the solution to 6-8. A glass plate is immersed in the coating agent for 10 min to 5 hr and the excess water is removed by centrifugal separation, heating, spontaneous drying, etc. to obtain a glass plate for the immobilization of nucleic acid. A proper amount of a nucleic acid solution is dropped on the glass plate, the plate is irradiated with ultraviolet rays to immobilize the nucleic acid and the non-immobilized nucleic acid, etc. are removed with an acid, hot water, alcohol, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-63154

(P2000-63154A)

(43) 公開日 平成12年2月29日 (2000.2.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト [*] (参考)
C 0 3 C 17/32		C 0 3 C 17/32	A 4 B 0 2 4
C 0 9 D 177/04		C 0 9 D 177/04	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 4 G 0 5 9
C 1 2 Q 1/68		C 0 8 G 69/10	4 J 0 0 1
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-228426

(22) 出願日 平成10年8月12日 (1998.8.12)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 畠山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸固定用ガラスプレート

(57) 【要約】

【課題】 表面に効率的にDNA等の核酸を安定に固定化することができるガラスプレートを提供することを課題とする。

【解決手段】 カルボキシル基を官能基として有するポリマーを用いてガラスプレートの表面をコーティングする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルボキシル基を官能基として有するポリマーで表面をコーティングしたガラスプレート。

【請求項2】 前記ポリマーがポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸の少なくとも何れか一方を含む請求項1記載のガラスプレート。

【請求項3】 前記コーティングしたガラスプレートのコーティング面に核酸を固定化した請求項1または2記載のガラスプレート。

【請求項4】 固定化された核酸を用いて試料中の核酸を解析する方法において、請求項3記載のガラスプレートを用いることを特徴とする核酸の解析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、表面を化学物質でコーティングされたガラスプレートに関し、詳しくは、核酸の塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノム遺伝子の発現モニタリング等の核酸の解析に使用することができるハイブリダイゼーション用のDNAアレーに好適に利用できる、表面を化学物質でコーティングされた新規なガラスプレートに関する。

【0002】

【従来の技術】ハイブリダイゼーションによる遺伝子の解析は、例えば塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノム遺伝子の発現モニタリング等において広く行われている。例えば、SBH (sequencing by hybridization) [R. Drmanac et al., Science, 260, 1649 (1993)]、すなわちハイブリッド形成による塩基配列決定法は、高速かつ低コストな方法として実用化が期待されている。また、例えば、DNAアレーを用いた遺伝子発現

【0003】これらの遺伝子の解析においては、DNA、RNAまたはこれらの混合物等の核酸をプレート上に固定化したDNAアレーあるいはDNAチップとよばれるものが用いられる。

【0004】DNAを固定化するプレートとしては、ナイロン膜、ポリプロピレン膜、ニトロセルロース膜、ガラスプレート、シリコンプレート等が用いられるが、ハイブリダイゼーションの検出をRIを使用せずに蛍光物質を用いて行うことを考えると、蛍光物質を含まないガラスプレート、シリコンプレート等が適していると考えられている。

【0005】しかしながら、ガラスプレート等の表面は核酸を固定化するのに適切な官能基を有せず、表面を何らかの化学物質でコーティングする必要がある。ガラスプレートのコーティング法としては、従来、アミノシランを用いてコーティングする方法 [Z. Guo et al., Nucleic Acids Res., 22, 5456-5465 (1994)]、または、

ポリリジンを用いてコーティングする方法 [M. Schena et al., Science, 270, 467-470 (1995)] が知られている。このうち官能基としてアミノ基を有するポリリジンを使用する方法は、細胞、タンパク質、または、染色体 (タンパク質を含む) 等には比較的適した方法であるが、核酸を固定するのには適していないため、この方法によりDNAを固定したプレートを用いてDNAを解析する場合、DNAの固定量が十分ではなく、また、固定化されたDNAも解析中の安定性が十分ではなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、表面に効率的にDNA等の核酸を安定に固定化することができるガラスプレートを提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ガラスプレート上をポリアスパラギン酸でコーティングすることにより、ガラスプレート上に効率的にDNA等の核酸を固定化できることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0008】即ち、本発明はカルボキシル基を官能基として有するポリマーで表面をコーティングしたガラスプレートである。また、本発明は前記ポリマーがポリアスパラギン酸またはポリグルタミン酸の少なくとも何れか一方を含む前記ガラスプレートである。

【0009】更に本願発明は前記コーティングしたガラスプレートのコーティング面に核酸を固定化した前記ガラスプレートである。また、更に本発明は、固定化された核酸を用いて試料中の核酸を解析する方法において、前記ガラスプレートを用いることを特徴とする核酸の解析法である。

【0010】本発明によると、ガラスプレート上をポリアスパラギン酸等でコーティングすることにより、ガラスプレート上に官能基としてカルボキシル基を付与しDNA等の核酸のガラス表面への固定化を容易にすることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明のガラスプレートは、カルボキシル基を官能基として有するポリマーを含むコーティング剤で表面をコーティングすることにより得ることができる。

【0012】まず最初にこのコーティング剤について説明する。

(1) コーティング剤

本発明のガラスプレートを作成するために使用するコーティング剤としては、カルボキシル基を官能基として有するポリマーの溶液を使用することができる。

【0013】カルボキシル基を官能基として有するポリマーは、ガラスプレートの表面を均一にコーティングするという点から、ある程度の粘性を有する高分子量のも

のが好ましく、具体的にはその分子量は、500～5000、000程度であるのが好ましく、1,000～2000、000であるのが更に好ましい。また、ポリマー中のカルボキシル基は官能基として存在すれば良く、この際カルボキシル基は、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等の塩として存在していてもかまわない。

【0014】ここで、ポリマー中のカルボキシル基の数は特に限定されないが、核酸を効率よく安定にガラスプレートの表面に固定するという点からは、ポリマー分子当たりのカルボキシル基が多い方が好ましい。また、このカルボキシル基は、ポリマー分子中に規則的に存在していても、不規則に存在していても良いが、核酸を均一に固定するという点からは、規則的に存在するものが好ましい。このポリマーは、ガラス表面を均一にコーティングするという点からは、アミノ酸から構成されていて安定した α ヘリックス構造を形成するポリマー、即ちポリアミノ酸であるのが好ましい。

【0015】具体的には、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、アスパラギン酸とグルタミン酸のポリマー等が例示でき、これらのポリアミノ酸を使用するのが好ましい。これらのポリアミノ酸は、100%アミノ酸から構成されている必要はなく、ポリアミノ酸の各種誘導体も含まれる。

【0016】尚、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸は、市販されており、一般に入手可能である。次に、本発明で使用するガラスプレートについて説明する。

(2) ガラスプレート

本発明で使用するガラスプレートとしては、通常市販されているガラスプレートを使用することができる。取り扱い易さ、再利用性、コスト等の点からはガラスプレートを使用するのが好ましい。また、その後の遺伝子の解析等を蛍光物質を使用して行う場合を考慮すると、蛍光物質を含まないガラスプレートを使用するのが好ましい。ガラスプレート等の厚さ及び大きさは特に限定されず、適宜その後の解析等の使用目的に合わせて選択して使用することができる。

【0017】尚、前述のコーティング剤は、ガラスプレートの代わりにプラスチックプレート等の官能基を表面に有するプレートにも適用できる。プラスチックプレートの具体例としては、メタクリル樹脂、ポリ-4-メチルベンテン-1等が例示できる。

【0018】次に、本発明のガラスプレートの製造について以下説明する。

(3) 表面をコーティングしたガラスプレートの製造
ガラスの表面にコーティング剤を固定する方法は、所定濃度の上記コーティング剤溶液中に、上記ガラスプレートを所定時間含浸することにより行うことができる。コーティング剤として使用するポリマー溶液は、官能基としてカルボキシル基を有する点を考慮すると、水溶性の溶液が好ましい。また、カルボキシル基を官能基として

機能させるためにはポリマー溶液のpHを6～8に維持して行うのが好ましい。有機溶媒を適宜加えて行うこともできる。使用するポリマーの濃度は、ポリマーの分子量、溶解性にもよるが、ガラスプレートの表面を均一にコーティングするという点からは、0.01g/l～50g/lであるのが好ましく、0.5g/l～5.0g/lであるのが更に好ましい。溶液に含浸する場合の時間は、特に限定されないが通常10分～5時間程度である。そして、ガラスプレートの表面の余分な水分等を、遠心分離、加熱、自然乾燥等を適宜組合わせて除去することによりガラスプレート上にポリマーを固定することができる。均一にコーティングをするという点からは遠心分離法により、溶液を均一の分散し、余分な溶液を除去するのが好ましい。

【0019】上記の様に製造した本願発明のガラスプレートは以下に示す方法により、コーティングしたガラスプレートのコーティング面に核酸を固定することで、核酸を固定したガラスプレートを作成することができる。

(4) 核酸のガラスプレートへの固定化

上記の本願発明はガラスプレートは、核酸(オリゴヌクレオチドを含む)のみならずアミノ酸、タンパク質等様々な物質のガラス表面への固定化に適したプレートであるが、核酸を固定化するのに使用するのが好ましい。

【0020】本発明のガラスプレートに固定化する核酸は、デオキシリボヌクレオチド(DNA)であってもよく、またリボヌクレオチド(RNA)であってもよい。これらの核酸の分子量等は特に限定されず、合成したオリゴヌクレオチドであつても天然の核酸であっても良いし、PCR産物等を使用しても良い。

【0021】また、本明細書において「試料核酸」という用語を使用するが、「試料核酸」とは、塩基配列の解析を目的として本発明のガラスプレートに固定化した核酸(オリゴヌクレオチドを含む)とハイブリダイズさせる核酸を意味する。

【0022】試料核酸の解析を後に述べるハイブリダイゼーションによって行う場合、試料核酸または本発明のガラスプレートに固定化する核酸(オリゴヌクレオチドを含む)のいずれかが標識されていることが好ましい。標識化の方法は特に限定されるものではなく、例えば、ラジオアイソトープや蛍光色素を用いる手法等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションの結果は、各種標識法に即した方法によって測定することができる。但し、後に述べる遺伝子発現モニタリング法においては、試料核酸を検出波長の異なる複数の蛍光色素で標識することにより、試料核酸間の発現の強弱を並行して検出できるため、蛍光法による標識を用いるのが好ましい。

【0023】これらの核酸をガラスプレートへ固定化する方法を以下に例示する。核酸のガラスプレートへ固定化は、適量の核酸溶液を本発明のガラスプレート上に滴下し、乾燥、紫外線照射または両者を併用することによ

り行うことができる。核酸をガラスプレートへ安定に固定化するという点からは紫外線を照射するのが好ましい。その後の解析に使用することを考慮すると、ガラスプレート上に固定されていない核酸等を取り除くため各種の酸、熱湯、アルコール等を用いて後処理をすることが好ましい。この際、例えば、SMP溶液（5 μ gの無水コハク酸を、315mlの1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、0.2Mホウ酸ナトリウム溶液（pH8.0）35mlを添加した溶液）を使用することができる。

【0024】なお、これらの最適な条件は、条件に適宜変更を加えることにより、後に述べる各種の遺伝子解析方法による測定結果に基づいて、条件を適宜変更を変えることにより決定することができる。

【0025】このようにして作製された核酸を固定したガラスプレートは、DNAアレー（又はRNAアレー）またはDNAチップ（又はRNAチップ）と呼ばれ各種の遺伝子解析を行う際に利用される。

【0026】以下、核酸を固定したガラスプレートを「DNAアレー」と呼ぶことがあるが、DNAに限定されず、RNAを固定したガラスプレートも含まれる。DNAアレーの作製方法としては、上記の例示の他に、プレート上に直接オリゴヌクレオチドを合成する方法 [A. C. Pease et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 5022-5026 (1994)]、合成したオリゴヌクレオチド [Z. Guo et al., Nucl. Acids Res., 22, 5456-5465 (1994)]、または、PCR産物等 [M. Schena et al., Science, 270, 467-470 (1995)] をガラスプレート上に固定化する方法がある。

【0027】そして、本発明の方法により作製されたDNAアレーは、DNA固定化量が多く、また、安定であり、ハイブリダイゼーション法により遺伝子を解析しようとする場合、感度よく、定量的に、再現性高く、繰り返し使用できる。

（5）核酸の解析法

このようにして作製したDNAアレーを使用した核酸の解析法を以下に説明する。

【0028】本発明の塩基配列解析の応用例としては、ハイブリダイゼーション法を用いたDNA塩基配列の決定 [Genomics, 13 1378 (1992)] や感染症及び遺伝的疾患の診断等があり、これらの技術を巨大ゲノムDNAのマッピング、遺伝子発現モニタリング等に応用可能である。感染症の診断法としては、例えば、被験者の血液等よりDNAを抽出し、そのDNAに対して各種病原体固有の配列から本発明の方法によりDNAプローブを作製し、ハイブリダイゼーション反応を行い、病原体の存在を検出する方法が挙げられる。遺伝的疾患の診断法としては、遺伝病の原因遺伝子に特異的な配列をもとに本発明の方法によりオリゴヌクレオチドを作製し、被験者より得た染色体DNAとのハイブリダイゼーションを行い、その遺伝子中の変異の有無を検出

する方法が挙げられる。また、巨大ゲノムDNAのマッピングはゲノムDNA解析プロジェクト等には必須の技術であるが、本発明の方法で作製した多数のDNAプローブをゲノムバンク中のDNAとハイブリダイゼーションさせることにより、各クローンのゲノム上での配置を効率的に決定することができる [第16回日本分子生物学会年会 講演要旨集 1334 (1993)]。

【0029】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例により本発明は何等限定されるものではない。

（A）ガラスプレートのポリアスバラギン酸によるコーティング

ポリアスバラギン酸ナトリウム溶液 [シグマ社製、分子量15,000~50,000 (2g/l、塩酸でpH7に調整)] 350mlにスライドグラス30枚を1時間浸した後、ガラスプレートをマイクロタイタープレートキャリアー上で500rpmで遠心し、ガラス表面の液体を取り除いた。スライドグラスを風乾した後、40°Cで5分間保温したのち室温で保存した。

（B）試料DNAの標識化

試料DNAとしてはプラスミドpGEM5Zf(+)（プロメガ社）を用いた。プラスミドの標識化は、Label IT（宝造（株）製）を用いて、蛍光標識（フルオレセイン）により行った。

（C）試料DNAの固定化

上記（B）で標識したプラスミドDNAを0.5 mg/mlの濃度になるように3×SSC [Sambrook et al., Molecular Cloning, 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)] に溶解した。試料DNA 1 μ lを、上記（A）で作製したポリアスバラギン酸コートガラスプレートにスポットした。対照としてポリリジンコートガラスプレート（シグマ社）を用いて同様にスポットした。スポットを風乾した後、湿潤箱中で45°Cで1分間保温した。ガラスプレートを100°Cのホットプレート上で5秒間瞬間乾燥させた後、UVクロスリンカー（フナコシ社製）を用いて60 mJの紫外線（254nm）を照射した。次に、SMP溶液（5 μ gの無水コハク酸を、315mlの1-メチル-2-ピロリドンに溶解し、0.2Mホウ酸ナトリウム溶液（pH 8.0）35mlを添加した溶液）に10分間浸した。95°Cの熱湯で2分間洗浄した後、95%エタノールで1分間洗浄した。ガラスプレートをマイクロタイタープレートキャリアー上で500rpmで遠心し、ガラス表面の液体を取り除いた。

（D）固定化されたDNA量の測定

固定化されたDNA量の測定は、プラスミドを標識した蛍光の量を定量することによって行った。蛍光量の検出にはフルオロイメジャー（FluoroImager）（モレキュラーダイナミックス社）を用いた。

【0030】その結果を表1に示す。結果は対照とした

ポリリジンコートガラスプレートを使用した場合の蛍光強度を1とする相対値で示した。ポリアスパラギン酸コートガラスプレートを使用した場合、ポリリジンコートガラスプレートを使用した場合に比較して10倍近い量の*

* DNAが固定されていることが判った。
【0031】
【表1】

表1

ガラスプレート	蛍光強度
ポリリジンコートガラスプレート	1
ポリアスパラギン酸コートガラスプレート	9.5

【0032】

【発明の効果】本発明により、DNA等の核酸を効率よく安定に固定したガラスプレートを提供することができ、また、本発明の核酸を固定したガラスプレートは、※

※ハイブリダイゼーション法により遺伝子を解析する場合、DNAの固定化量が多いため感度がよく少量の物質の検出にも利用でき、安定であるため再現性、定量性に優れている。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
// C 0 8 G 69/10

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

テーマコード(参考)
A 4 J 0 3 8

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA13 AA20 CA01 CA09
CA11 EA04 HA14 HA19
4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 CC08
FA15
4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ03
QQ42 QQ52 QR32 QR56 QR84
QS03 QS11 QS20 QS34 QS36
QX02
4G059 AA04 FA07 FB04 FB05
4J001 DA01 EA36 FA03 FB01 FC01
JA20
4J038 DH011 EA011 GA06 GA09
PC03